马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld-HSP60* 的克隆、序列分析及温度胁迫下的表达

魏长平[1,2], 蒋　健[2], 李祥瑞[2,*], 张云慧[2], 张方梅[4], 程登发[2], 郭文超[3], 刘　怀[1,*]

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 新疆农业科学院植物保护研究所, 乌鲁木齐 830091; 4. 信阳农林学院, 河南信阳 464000)

摘要:【目的】马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 是一种世界性检疫害虫,对温度胁迫具有极强的适应性,为进一步明确其对温度胁迫适应性的分子机制,研究了热激蛋白 HSP60 在马铃薯甲虫温度胁迫应答过程中的作用。【方法】采用 RT-PCR 及 RACE 技术克隆马铃薯甲虫热激蛋白 HSP60 基因的 cDNA 全长序列;利用生物信息学软件分析该基因及其编码蛋白质的序列特性;运用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在温度胁迫下的表达模式。【结果】克隆得到马铃薯甲虫热激蛋白 HSP60 基因,命名为 *Ld-HSP*60(GenBank 登录号: KC556801),其 cDNA 全长 2 234 bp,开放阅读框(ORF)长 1 731 bp,编码 576 个氨基酸,相对分子量约为 61.27 kD,理论等电点为 5.51,5′端非翻译区(UTR)长 101 bp,3′UTR 长 402 bp。氨基酸序列中含有 HSP60 家族典型的特征序列。实时荧光定量 PCR 结果表明,低温胁迫(-10 和 0℃)下未检测到马铃薯甲虫雌雄成虫中 *Ld-HSP*60 的诱导表达;高温胁迫(38 和 44℃)诱导马铃薯甲虫雄成虫 *Ld-HSP*60 上调表达,随着胁迫温度的升高 *Ld-HSP*60 表达量呈现先升高后降低的趋势,38℃高温胁迫下表达量最高,胁迫时间越长 *Ld-HSP*60 表达量也越高。【结论】相比其他热激蛋白,HSP60 对温度敏感性较低,推测 HSP60 可能在马铃薯甲虫雄成虫抵御高温胁迫中发挥作用。

关键词: 马铃薯甲虫; 热激蛋白; HSP60; 基因克隆; 温度胁迫; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2017)05-0523-10

Cloning and sequence analysis of heat shock protein gene *Ld-HSP60* in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its expression under temperature stress

WEI Chang-Ping[1,2], JIANG Jian[2], LI Xiang-Rui[2,*], ZHANG Yun-Hui[2], ZHANG Fang-Mei[4], CHENG Deng-Fa[2], GUO Wen-Chao[3], LIU Huai[1,*] (1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumchi 830091, China; 4. Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang, Henan 464000, China)

Abstract:【Aim】As one of international major quarantine pests, the Colorado potato beetle, *Leptinotars decemlineata*, has strong resistance to temperature stress. The study aims to better understand the molecular mechanism of resistance to temperature stress in *L. decemlineata* by determining the role of heat shock protein HSP60 in response to temperature stress in this beetle.【Methods】The full-length cDNA encoding HSP60 from *L. decemlineata* was cloned by RT-PCR and RACE technologies. Bioinformatics programs were used to analyze the sequence characteristics of the gene and amino acid sequence. The

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103026-2)

作者简介: 魏长平, 男, 1988 年生, 甘肃武威人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: wcpboke@yeah.net

* 通讯作者 Corresponding authors, Email: xrli@ippcaas.cn; liuhuai@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-03-01; 接受日期 Accepted: 2017-03-28

mRNA expression levels of the gene in *L. decemlineata* under cold and heat stress conditions were detected by real-time PCR. 【Results】The complete cDNA of the gene encoding heat shock protein HSP60 was obtained from *L. decemlineata*, and named *Ld-HSP*60 with the GenBank accession no. of KC556801. The complete cDNA (2 234 bp) is comprised of a 101 bp 5′ untranslated region (UTR), a 402 bp 3′ UTR, and a 1 731 bp open reading frame (ORF). The ORF of *Ld-HSP*60 encodes a protein of 576 amino acids, with the molecular weight of 61.27 kD and the theoretical pI of 5.51. The mature amino acid sequence contains the classical signature sequences of HSP60 family. The real-time PCR results showed that low temperature stress (−10 and 0℃) did not induce the expression of *Ld-HSP*60 in male and female adults of *L. decemlineata*; however, high temperature stress (38 and 44℃) induced the up-regulated expression of *Ld-HSP*60 in male adults, and the expression trend of *Ld-HSP*60 rose first and then fell with the increasing temperature. The expression level of *Ld-HSP*60 reached the maximum at 38℃, and the longer the stress time the higher the expression level. 【Conclusion】HSP60 is less sensitive to temperature than other heat shock proteins, and it is inferred that HSP60 may play a role in resistance to high temperature stress in male adults of *L. decemlineata*.

Key words: *Leptinotarsa decemlineata*; heat shock protein; HSP60; gene cloning; temperature stress; real-time PCR

马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Say)是国际公认的毁灭性检疫害虫,也是我国重要外来入侵物种和对外重大检疫对象之一。该虫原产于墨西哥(Alyokhin, 2009),自 1993 年传入我国新疆后,10 多年来疫区面积扩大了数百倍,距与甘肃交界的星星峡仅 600 km,2014 年又侵入黑龙江省东北部芬河市、东宁县和虎林市,直接威胁全国马铃薯主产区生产安全(王俊等, 2008; 赵星民和秦海玲, 2016)。有研究表明,温度是影响昆虫生长发育和分布扩散的关键因子之一(Damos and Savopoulou-Soultani, 2012; Stratman *et al.*, 2014),马铃薯甲虫具有很强的耐寒性和耐高温能力,其可能进化出某种对极端温度环境的适应性机制。在全球气候变暖的趋势下,研究昆虫对温度胁迫的适应过程、应激反应特征和调控机制对昆虫的科学防治具有重要意义。

目前已基本明确了马铃薯甲虫生长发育与温度之间的关系,该虫在欧洲和美洲的最适发育温度范围为 20 ~33℃(Kaitazov, 1964; Ferro *et al.*, 1985),而我国新疆地区种群的最适发育温度范围为 23 ~27℃(洪波等, 2009; 周昭旭等, 2010)。针对马铃薯甲虫高温抗性方面,国外在 20 世纪开展了系列研究,当温度超过 33℃时,其死亡率才开始逐渐增加(Logan *et al.*, 1985),以 4 龄幼虫和成虫的高温抗性最强,在 50℃条件下成虫达到 50% 死亡率(LT_{50})的时间为 1 ~2 h (Tilavov, 1969);而在我国新疆地区种群的耐热性相对较差,50℃条件下处理成虫 20 ~25 min 的死亡率就达 100%(张智等, 2010)。而在抗寒性研究方面,马铃薯甲虫越冬成虫不同时间、不同地区过冷却点存在很大差异,俄罗斯种群过冷却点在 −6.15 ~ −5.7℃,加拿大种群平均过冷却点为 −8.8℃,而我国新疆种群的过冷却点为 −7.89 ± 0.07℃(Minder and Chesnek, 1970; Gilles and Warren, 1996; 张云慧等, 2012)。

从分子水平上对马铃薯甲虫温度适应性机理的研究较少,热激蛋白(heat shock protein, HSP)诱导表达是目前研究最多也是被认为与生物耐热性关系最密切的因素。热激蛋白是生物受到外界应激刺激后表达的蛋白质,其作为分子伴侣协助细胞多肽或蛋白质正确转运、折叠和装配,对维持细胞生存和内环境稳定起着重要的作用(Feder and Hofmann, 1999; Arya *et al.*, 2007)。热激蛋白在进化上高度保守,在整个生物界中普遍存在,基于蛋白质分子量和序列同源性可分为 6 个家族:HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 和小分子 HSP (Sørensen *et al.*, 2003; Arya *et al.*, 2007)。HSP60 是热激蛋白家族的重要成员之一,它参与了许多生物的热应激反应。大量研究表明,在温度胁迫条件下热激蛋白的表达量存在明显的变化。HSP60 在轮虫 *Brachionus manjavacas* 耐热性中是必需的(Smith *et al.*, 2012),高水温下其上调表达与珊瑚 *Seriatopora hystrix*, *Montipora monasteriata* 和 *Acropora echinata* 白化有关(Seveso *et al.*, 2014)。通过检测鸡和鸭在高温胁迫下不同组织和胚胎发育不同时期 *HSP*60 的表达量,证明其参与胚胎发育和热胁迫应答(Wang *et al.*, 2012; Al-Zghoul *et al.*, 2015)。此外,近年来研究证实 HSP60 在重金属(Zhu *et al.*, 2013; Jiang *et al.*,

2016）、有机物（Singh *et al*., 2009）、氧化（Li *et al*., 2014）和高盐（Seveso *et al*., 2013）等环境胁迫应答和免疫过程中也发挥重要的作用（Xu *et al*., 2011）。在昆虫中，关于热激蛋白的研究主要集中在 HSP90 和 HSP70，HSP60 在昆虫热应激反应中的表达特点及功能的研究报道较少。我们之前已经研究了马铃薯甲虫 *HSP*90 在高温和低温胁迫下的表达特点（蒋健等，2013），在此基础上本研究利用生物信息学手段结合 RT-PCR 及 RACE 技术克隆了马铃薯甲虫热激蛋白基因 *HSP*60，并利用实时荧光定量 PCR 技术检测了高温和低温胁迫条件下马铃薯甲虫雌雄成虫体内 *HSP*60 的表达差异，初步分析 *HSP*60 在温度胁迫下的表达特点及其与温度耐受性之间的关系，探讨可能的作用机制，进而为了解马铃薯甲虫对温度适应性及扩张机制提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（雌雄成虫）采自新疆农业科学院植物保护研究所安宁渠试验基地马铃薯试验田（87°28′28″E，43°57′7″N）。供试马铃薯甲虫在实验室自然环境下，用新鲜马铃薯 *Solanum tuberosum* 叶片饲养于养虫盒内。马铃薯品种为紫花白，全生育期不施用任何农药。

1.2　主要试剂

总 RNA 提取试剂 TRIzol 和 M-MLV Reverse Transcriptase 均购自 Invitrogen 公司；3′Full RACE Core Set Ver. 2.0 Kit、dNTP、Taq 酶和 SYBR Premix Ex Taq™（Perfect Real Time）均购自 TaKaRa 公司；胶回收试剂盒（E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit）购自 OMEGA 公司；克隆载体 pEASY-T1、感受态细胞 Trans1-T1 和 DNA marker 均购自 Transgene 公司。引物合成与测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.3　马铃薯甲虫 HSP60 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

1.3.1　总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成：采用 Trizol 法提取供试昆虫总 RNA，结合微量紫外分光光度仪（NanoDrop ND-1000，USA）和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量和浓度。在反转录酶 M-MLV 的作用下合成 cDNA 第 1 链，具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3.2　HSP60 基因片段的筛选及克隆验证：在 NCBI 数据库中筛选得到一个马铃薯甲虫 HSP60 基因片段（GenBank 登录号：EB759692）。利用 Primer3（http://frodo.wi.mit.edu/）在线软件设计特异性引物（表 1），以反转录的 cDNA 第 1 链为模版进行 PCR 扩增，PCR 反应体系为 30 μL：超纯水 20.3 μL，5×Go Taq PCR buffer 6 μL，dNTP Mix（10 mmol/L）1.5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，Go Taq DNA Polymerase（5 U/μL）0.2 μL，模板（cDNA 第 1 链）1 μL。反应条件：95℃ 预变性 5 min；然后 95℃ 变性 30 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。回收目的片段后连接到 pEASY-T1 载体中，转化至 Trans1-T1 感受态细胞，挑选阳性克隆测序，验证预测序列的正确性。

表 1　本研究所用引物序列

Table 1　Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences	引物功能 Functions of primers
H60F1	TCTACGCAAAGCTCAGCAAA	HSP60 基因片段扩增 Amplification of HSP60 gene fragment
H60R1	CCGGCTTCTTCATTTGTGTT	
H60F2	GGGGTTGATATTCTTGCT	HSP60 基因 3′RACE 扩增 3′RACE of HSP60 gene
H60F3	TTTCCGATTTGGGACAGA	
H60F4	ATGTATCGACTACCTATTGCTGTTCGGTCATTA	ORF 扩增 Amplification of ORF
H60R4	TTACATCATTCCACCCATTCCGCCCATGCCTCC	
FQ	TGGTGAAGCTTTGACGACAC	实时荧光定量 PCR Real-time PCR
RQ	TCGGTCAAAGTTGCCTTTCT	
GADPH-F	GATTCCACTCACGGACGATT	内参基因扩增 Amplification of the reference gene
GADPH-R	CATATTTGCCCCAAGGAATG	
TUB-F	CTGCCTCTTTGAGGTTCGAC	
TUB-R	TTACTGGGGCGTAAGTGACC	

1.3.3 RACE 扩增:根据上述已验证的 HSP60 基因片段序列,设计特异性引物(表 1),进行 3′RACE,具体步骤按照试剂盒说明书进行。扩增产物克隆测序步骤同 1.3.2 节。

1.3.4 序列分析:利用 DNAMAN 软件将得到的 *HSP*60 cDNA 片段进行拼接,以获得全长 cDNA 序列。利用 Compute pI/Mw tool(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白质一级结构,利用在线工具 Biology WorkBench (http://workbench.sdsc.edu/)获得基因开放阅读框。应用 NCBI Blast 工具进行序列比对分析。应用 SWISS-MODEL(http://swissmodel.expasy.org/)进行蛋白三维结构的预测,用 PyMOL 软件对三维结构进行编辑与输出。

1.4 马铃薯甲虫 HSP60 基因在温度胁迫下的表达

1.4.1 供试昆虫的处理:将马铃薯甲虫雌雄成虫在低温(-10 和 0℃)及高温(38 和 44℃)分别处理 1 和 4 h。每个温度处理都重复 3 次,每个重复处理 10 头马铃薯甲虫。处理完成后,将每个处理的单头马铃薯甲虫迅速解剖成厚度不超过 0.5 cm 的小块,浸入含 RNA 组织样品保存液(RNAlater)的 0.5 mL 离心管中,并置于 4℃过夜,第 2 天取出后于 -80℃冰箱保存备用。以室温(25℃)下饲养的马铃薯甲虫作为对照。

1.4.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成:利用 TRIzol 法提取 1.4.1 节处理试虫的总 RNA,将总 RNA 样品定量至 1 μg,在反转录酶 M-MLV 作用下合成 cDNA 第 1 链。

1.4.3 内参基因的筛选及引物设计:筛选 *GADPH* 和 *TUB* 为内参基因,取其几何平均数来校正定量结果,内参基因扩增引物分别为 GADPH-F 和 GADPH-R 以及 TUB-F 和 TUB-R(表 1);根据本试验克隆得到的目的基因 cDNA 序列,设计并筛选出实时荧光定量 PCR 引物 FQ 和 RQ(表 1)。

1.4.4 标准曲线的制作:将 cDNA 样品 5 倍梯度稀释后作为模板制作标准曲线。实时荧光定量 PCR 反应使用荧光染料 SYBR Green Ⅰ 在 ABI 7500 Fast Real-Time PCR 仪上进行。反应条件:95℃ 预变性 30 s;然后 95℃变性 3 s,60℃退火与延伸 30 s,共 40 个循环;最后在 60~95℃之间探测产物的溶解曲线以检测引物的质量。

1.4.5 马铃薯甲虫 HSP60 基因表达量的检测:将 1.4.2 节合成的 cDNA 稀释 10 倍作为模板进行实时荧光定量 PCR 检测。每个样品重复测定 3 次,取平均值为该处理的 C_t 值。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$法来计算马铃薯甲虫 HSP60 基因的相对表达量,计算公式如下:

马铃薯甲虫 HSP60 基因相对表达量 $=2^{-\triangle\triangle Ct}$;

$\triangle\triangle Ct=\triangle Ct$(处理组) $-\triangle Ct$(对照组);

$\triangle Ct=$马铃薯甲虫 HSP60 基因平均 Ct $-$ 内参基因平均 Ct;

内参基因平均 Ct $=\sqrt[2]{Ct(GADPH)\times Ct(TUB)}$。

1.5 数据分析

所用数据处理软件为 IBM SPSS Statistics 20,对不同温度处理样品中马铃薯甲虫 HSP60 基因相对表达量的差异进行显著性方差分析采用 LSD 法;不同处理时间之间的基因相对表达量差异显著性分析采用独立样本 t 检验;显著性水平均为 $P\leqslant 0.05$。

2 结果

2.1 马铃薯甲虫 HSP60 基因全长 cDNA 序列的克隆

根据生物信息学分析,在 NCBI 数据库中筛选得到一个马铃薯甲虫 HSP60 基因片段(图 1: A),进而设计特异性引物 H60F2,进行 3′ RACE 扩增,获得一段长度为 1 004 bp 的 3′端部分序列(图 1: B)。在此基础上又设计特异性引物 H60F3,进行 3′ RACE 扩增,获得一段长度为 1 118 bp 的 3′端全长序列(图 1: C)。最后,利用 DNAMAN 软件将所有得到的片段序列进行拼接,获得长度为2 234 bp 的全长 cDNA 序列,以 H60F4 和 H60R4 引物扩增得到 1 731 bp 全长 ORF(图 1: D)。该全长 cDNA 序列 5′端非翻译区(UTR)长 101 bp,3′ UTR 长 402 bp,将其命名为 *Ld-HSP*60(GenBank 登录号: KC556801)。

2.2 *Ld-HSP*60 序列分析

*Ld-HSP*60 完整的开放阅读框编码 576 个氨基酸,预测其相对分子量为 61.27 kD,理论等电点为 5.51。推导的氨基酸序列中第 54-59 位氨基酸(TMGPKG)和第 76-82 位氨基酸(DGVTVAK)为 2 个 ATP/ADP 结合位点;第 109-119 位氨基酸(AGDGTTTATVL)为 Mg^{2+} 结合部位;第 215-217 位氨基酸(EGMKFDRGYISPY)为底物结合位点,第 427-441 位氨基酸(ATRAAVEEGIVPGGG)为经典的线粒体定位 HSP60 特征序列;第 561-575 位氨基酸(GGMGGMGGMGGMGGM)为一个高度保守的 C-末端 GGM 重复序列(图 2),这些序列特点为 HSP60 家族蛋白典型的序列特征,证明 Ld-HSP60 为定位于线粒体的热激蛋白家族 HSP60 的一员。

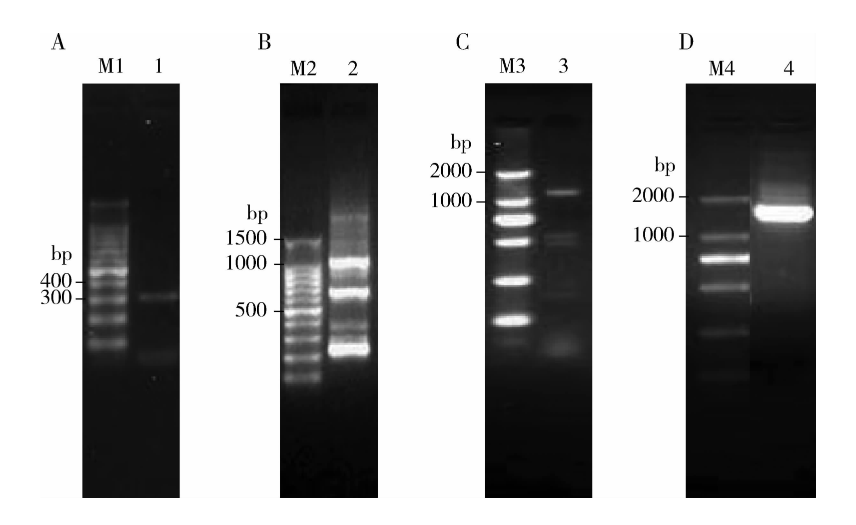


图 1　马铃薯甲虫 *Ld-HSP*60 RT-PCR 和 3′ RACE 产物

Fig. 1　The RT-PCR and 3′ RACE products of *HSP*60 from *Leptinotarsa decemlineata*

A：*Ld-HSP*60 小片段 PCR 扩增 PCR of *Ld-HSP*60 fragment；B，C：3′ RACE；D：*Ld-HSP*60 全长 ORF 扩增 Amplification of full-length ORF of *Ld-HSP*60. M1，M2：100 bp ladder；M3，M4：DL2000；1－4：PCR 产物 PCR products.

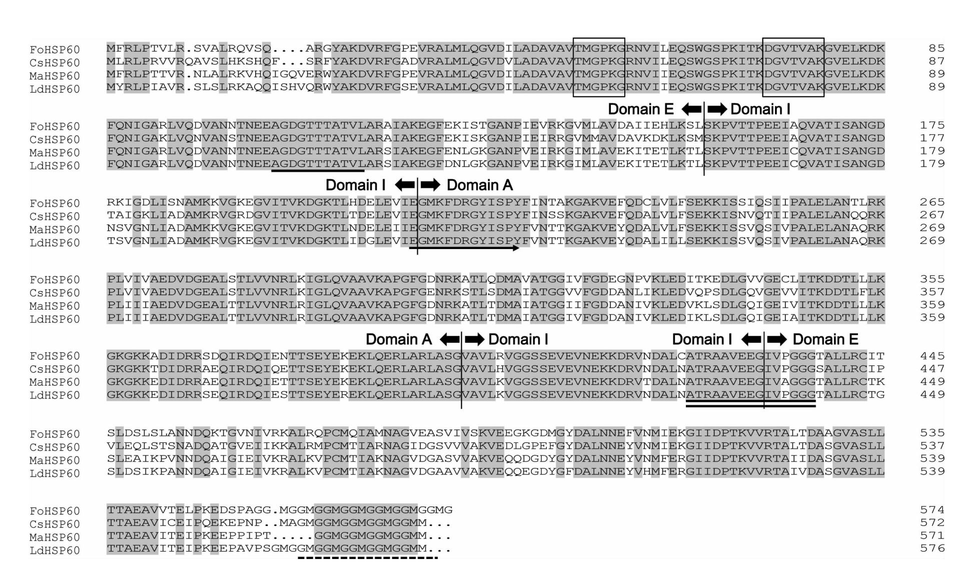


图 2　马铃薯甲虫与其他昆虫 HSP60 氨基酸序列比对

Fig. 2　Amino acid sequence alignment of HSP60 proteins from *Leptinotarsa decemlineata* and other insects

HSP60 蛋白来源及 GenBank 登录号 Origin of HSP proteins and their GenBank accession numbers：FoHSP60：西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*，AFN65687.1；CsHSP60：二化螟 *Chilo suppressalis*，ACT52824.1；MaHSP60：松墨天牛 *Monochamus alternatus*，APO36903.1；Ld-HSP60：马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*，AHB18586.1. 方框示 ATP 结合位点；单下划线示 Mg^{2+} 结合部位；箭头示底物结合位点；双下划线示经典的线粒体定位 HSP60 序列；虚下划线示 C-末端高度保守的 GGM 重复序列；粗箭头示 HSP60 蛋白亚基的 3 个结构域：顶部域（A），赤道域（E）和中间域（I）。ATP binding domains are illustrated in black boxes. Mg^{2+} binding domain is marked with single line. Substrate-binding site is marked with arrow line. A classical mitochondrial HSP60 signature is double-lined. Conserved GGM repeats at the C-terminal end are indicated as dotted line. The thick arrows indicate the three domains in each subunit of HSP60：the apical domain（A），the equatorial domain（E），and the intermediate domain（I）.

推导的氨基酸序列在 NCBI 进行 BlastP，与 PDB 数据库进行比对，选择人 *Homo sapiens* 的 HSP60 A 链为模板（PDB accession：4PJ1_A），利用 SWISS-MODL 工具建模，预测了马铃薯甲虫的 Ld-HSP60 蛋白的三维结构，预测的蛋白三维结构与已知其他物种的三维结构高度相似，该模型显示马铃薯甲虫 Ld-HSP60 蛋白含有 3 个结构域，分别为顶端域、赤道域和中间域。赤道域包含 ATP 和 Mg^{2+} 结合部位，顶部域包含底物结合部位（图 3）。

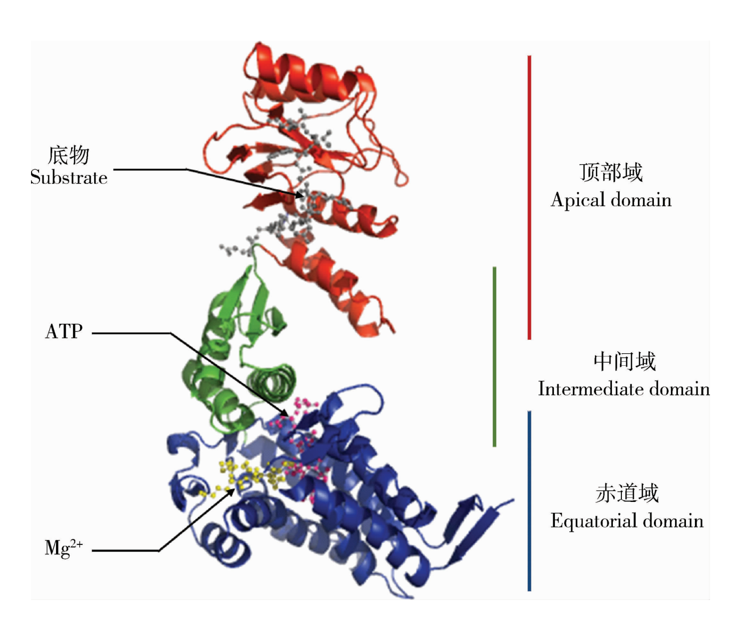


图 3 马铃薯甲虫 HSP60 蛋白亚基的三维结构预测

Fig. 3 Deduced three-dimensional structure of HSP60 of *Leptinotarsa decemlineata*

2.3 不同温度胁迫下 *Ld-HSP60* mRNA 的相对表达量

用特异性引物对 FQ/RQ, GADPH-F/GADPH-R 和 TUB-F/TUB-R 分别扩增 *Ld-HSP60*, *GADPH* 和 *TUB*,获得长度分别为 108, 124 和 111 bp 的定量片段。倍比稀释的 cDNA 样品作为模板,进行实时荧光定量 PCR 后,绘制每个基因的标准曲线,发现浓度每降低 5 倍,相应的 Ct 值就增加 2~3 次循环,得到引物的相关参数如表 2 所示,各引物的扩增效率在 104.188% ~105.113% 之间,且其相关系数 R^2 均大于 0.99。采集荧光信号进行溶解曲线分析,结果发现都只出现单一的信号峰,说明没有非特异性扩增。

选择 -10, 0, 25, 38 和 44℃这 5 个温度梯度,分别处理 1 和 4 h,检测马铃薯甲虫雌雄成虫体内 *Ld-HSP60* 的相对表达量。不同温度胁迫下,1 h 处理后马铃薯甲虫雌成虫体内 *Ld-HSP60* 的相对表达量与对照(25℃)相比均无显著差异,4 h 处理后与对照相比表达量虽略有升高,但也无显著性差异,可见无论是低温还是高温胁迫对马铃薯甲虫雌成虫体内 *Ld-HSP60* 的表达均没有明显的诱导作用(图 4: B)。马铃薯甲虫雄成虫在低温胁迫不同时间后,与对照(25℃)相比体内 *Ld-HSP60* 表达量无显著变化;在高温胁迫下,无论 1 h 还是 4 h 处理,随着胁迫温度的升高 *Ld-HSP60* 都呈现出先升高后降低的趋势,38℃时表达量达到最高。另外,38℃高温胁迫下,胁迫时间越长表达量越高,4 h 胁迫后 *Ld-HSP60* 的相对表达量是 1 h 胁迫后的 2.8 倍,为显著性差异($P<0.05$)(图 4: A)。

表 2 马铃薯甲虫目的基因与内参基因引物扩增参数

Table 2 Parameters derived from real-time PCR analysis of target and reference genes in *Leptinotarsa decemlineata*

基因名称 Gene name	基因产物 Gene product	斜率 Slope	相关系数 R^2 Correlation coefficient	扩增效率(%) Amplification efficiency
Ld-HSP60	热激蛋白 60 Heat shock protein 60	-3.205	0.9993	105.113
GADPH	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-3.220	0.9984	104.414
TUB	α 微管蛋白 α-Tubulin	-3.225	0.9984	104.188

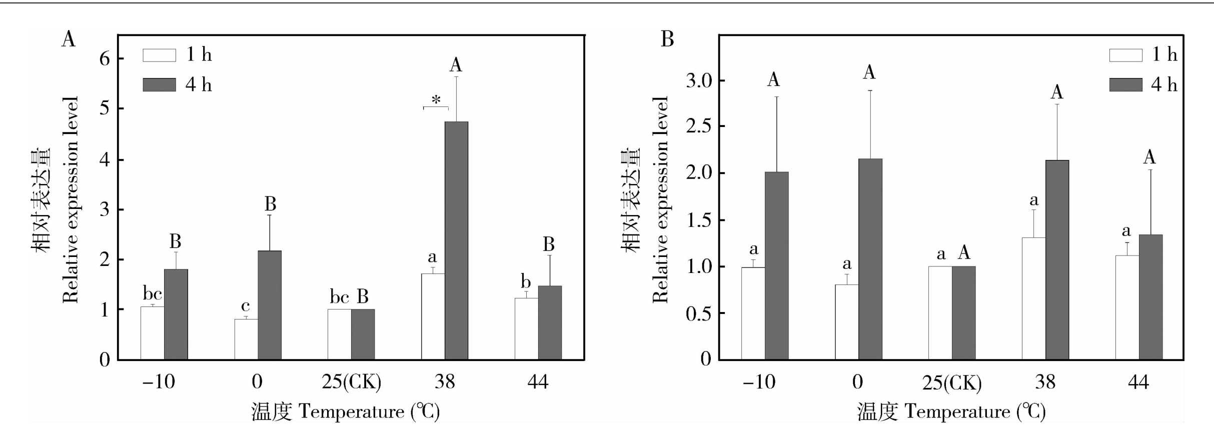


图 4　不同温度和处理不同时间后马铃薯甲虫雄(A)和雌(B)成虫中 *Ld-HSP*60 的相对表达量

Fig. 4　Relative expression levels of *Ld-HSP*60 in male (A) and female (B) adults of *Leptinotarsa decemlineata* after exposure to different temperature stress for different time

图中柱高数据为平均值 ± 标准误；柱上不同大小写字母分别表示处理 4 h 和 1 h 时不同温度处理间差异显著($P < 0.05$)(LSD 法)；星号表示两个处理时间之间差异显著($P < 0.05$)(独立样本 *t* 检验)。Data in the figure are mean ± *SE* and different letters above bars indicate significant difference among different treatment temperatures for 4 h and 1 h, respectively ($P < 0.05$) (LSD method). The asterisk indicates significant difference between the two treatment time ($P < 0.05$) (independent samples *t*-test).

3　讨论与结论

3.1　马铃薯甲虫 *Ld-HSP*60 序列分析

本研究通过生物信息学手段结合 RT-PCR 和 RACE 技术，首次成功克隆得到一个马铃薯甲虫 HSP60 基因 cDNA 全长序列，为 2 234 bp 的 *Ld-HSP*60。氨基酸序列的分析表明，序列中含有高度保守的 ATP 结合位点，具有 ATPase 活性，对 ATP 具有高度的亲和性，承担着构象转换的功能，与 HSP60 分子伴侣复合物的形成和调节底物蛋白折叠有关(Fenton *et al*., 1994; Brocchier and Karlin, 2000)。C-端含有高度保守的 GGM 重复序列，有趣的是相似的重复序列也存在于 HSP70 中，GGM 重复序列提供了带负电且柔和的疏水性界面，在蛋白折叠中起着至关重要的作用，促进了蛋白合成中间体的重新排列折叠(Tang *et al*., 2006)。线粒体定位 HSP60 特征序列也高度保守。预测的马铃薯甲虫 Ld-HSP60 蛋白三维结构与其他生物高度相似，具有 3 个结构域：包含底物结合部位的顶端域(apical domain)、包含 ATP 结合部位的赤道域(equatorial domain)以及连接顶端域和赤道域的中间域(intermediate domain)(Horwich *et al*., 2007)。大肠杆菌 GroEL-GroES 系统是目前研究最广泛的 HSP60 功能模型，顶部域暴露出介导底物结合的疏水性氨基酸残基，形成一个出口连接到 GroEL 空腔，GroES 像帽子一样扣在 GroEL 顶端形成一个空腔。GroEL 通过周期性的结合和释放 ATP 改变自身构象，当处于非活动状态时，HSP60 是疏水状态。当被激活后，中间域发生构象改变，顶部域暴露出亲水区域，从而确保与底物蛋白质的结合，结合后的蛋白质在 GroEL 和 GroES 形成的空腔内进行快速精确折叠，整个过程高度依赖于 ATP 水解偶联的构象改变(Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Kim *et al*., 2013)。根据 Ld-HSP60 氨基酸序列中包含的 ATP/ADP、Mg^{2+} 结合位点和 GGM 重复序列等结构特征，我们可以确定 Ld-HSP60 保守性很高，为定位于线粒体的 HSP60 家族中的一员，推测本试验所克隆的 *Ld-HSP*60 与其他生物体中的 *HSP*60 基因具有相似的功能。

3.2　马铃薯甲虫 *Ld-HSP*60 抗低温胁迫的功能分析

我们前期对马铃薯甲虫的抗寒性测定表明其成虫和卵的过冷却点最低，成虫的过冷却点最低可达到 -9.37℃(张云慧等, 2012)。因此，本研究将马铃薯甲虫成虫在 0 和 -10℃ 下分别进行低温胁迫，研究马铃薯甲虫体内热激蛋白的变化。结果发现无论胁迫 1 h 还是 4 h 雌成虫体内 *Ld-HSP*60 表达量均没有明显变化，雄成虫体内 *Ld-HSP*60 虽有升高但无显著差异。我们的研究结果与其他昆虫低温胁迫下的研究结果基本一致，旋毛虫 *Trichinella spiralis* (Wong *et al*., 2004)、西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Wang *et al*., 2014; Lu *et al*., 2016)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Colinet *et al*.,

2010）、美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativa* 和南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis*（Huang *et al.*, 2007；Huang and Kang, 2007；Huang *et al.*, 2009）在低温诱导胁迫下，HSP60 表达量均没有显著变化。相比其他热激蛋白，HSP60 对温度敏感性较低（Wang *et al.*, 2014），且在正常状态下表达水平就较高，以稳定状态存在于细胞质和线粒体基质中；应激环境中，HSP60 迅速从胞质中转移到线粒体基质以修复变性蛋白（Itoh *et al.*, 2002），可能不需要诱导上调表达就可以满足短期低温胁迫下的细胞损伤保护需求。蒋健等（2013）研究发现低温（0 和 −10℃）胁迫后 *Ld-hsp*90 的表达量与对照组相比均无显著性变化。我们推测低温胁迫并不能诱导马铃薯甲虫 *Ld-HSP*60/90 的上调表达。但是，另有研究表明 −5℃ 处理 1.5 h 可以诱导马铃薯甲虫体内的 HSP70 蛋白表达量升高（Lyytinen *et al.*, 2012），−10℃ 处理 2 h 后 *LdHSP70B* 的表达量显著升高，而 *LdHSP70A* 升高并不显著（Yocum, 2001），因此马铃薯甲虫是否还存在其他响应低温胁迫的保护机制有待进一步研究。

3.3 马铃薯甲虫 *Ld-HSP*60 抗高温胁迫的功能分析

马铃薯甲虫雄成虫在高温胁迫下，无论处理 1 h 还是 4 h，随着胁迫温度的升高 *Ld-HSP*60 表达量都呈现出先升高后减低的趋势，38℃ 时表达量达到最大，44℃ 时显著降低，这可能是由于 44℃ 高温对机体造成的损伤已经超出了 HSP60 对马铃薯甲虫成虫的保护能力，导致热激蛋白自身合成受到影响，这与我们前期开展的新疆地区马铃薯甲虫发育与温度关系结果相吻合，我们发现 35 ~ 41℃ 温度范围内，马铃薯甲虫死亡率随时间的延长而缓慢增长，从 44℃ 开始其死亡率迅速提高，48℃ 处理 1 h 就全部死亡，且 *Ld-hsp*90 表达量在 38℃ 时达到最高，44℃ 时显著下降（蒋健等, 2013），说明生物通过上调热激蛋白等相关机能来保护细胞损伤的能力是有限度的。

在本研究中雌成虫在高温胁迫下 *Ld-HSP*60 没有诱导上调表达，这种雌雄虫间热激蛋白表达量不同的现象也在烟粉虱 *Bemisia tabaci*（Lü *et al.*, 2011）和黑腹果蝇 *D. melanogaster*（Sørensen *et al.*, 2007）中被证明。我们前期室内模拟高温胁迫，发现马铃薯甲虫雌虫个体高温耐受能力大于雄虫（张智等, 2010），而且马铃薯甲虫雌成虫在田间的扩散能力要大于雄虫，从而有利于躲避不良环境（李超等, 2014），说明在响应环境胁迫时雌雄虫在温度胁迫下有不同的生存策略。我们推测这主要有两方面原因，一方面是在不良环境下雌虫必须要面对生存与生殖力之间的权衡（Lü *et al.*, 2014；Zhang *et al.*, 2016），而热激蛋白的过量表达对生物生长发育生存和繁殖有负面影响（Sørensen *et al.*, 2003）。另一方面，自然界在一种昆虫体内是几种热激蛋白协同发挥作用的，例如烟粉虱雌虫的耐热性高于雄虫，在高温胁迫时，其雌虫体内的 HSP23 和 HSP70 的表达量均高于雄虫（Lü *et al.*, 2011）。我们的研究结果提示，在研究昆虫温度胁迫后基因表达规律时要考虑到雌雄虫的胁迫应答差异，而目前国内外还没有马铃薯甲虫热激蛋白在雌雄虫之间的表达差异比较的相关报道。我们还需要进一步研究其他种类热激蛋白在马铃薯甲虫雌雄虫之间的表达情况，同时结合种群适合度研究进一步明确马铃薯甲虫温度胁迫与种群增长扩散之间的关系。

本研究成功克隆马铃薯甲虫 *Ld-HSP*60 基因全长 cDNA，据生物信息学分析该基因编码的 HSP60 蛋白质属于线粒体定位的热激蛋白 HSP60。低温胁迫未观察到马铃薯甲虫雌雄成虫中 *Ld-HSP*60 的显著性表达变化，高温胁迫可以诱导马铃薯甲虫雄成虫 *Ld-HSP*60 显著性上调表达，提示 *Ld-HSP*60 对低温不敏感，可能在马铃薯甲虫雄成虫抵御高温胁迫中发挥作用。本研究结果为进一步理解马铃薯甲虫抗温度胁迫能力及温度胁迫后种群动态规律提供了分子基础。

参考文献（References）

Alyokhin A, 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit Vegetable Cereal Sci. Biotechnol.*, 3: 10 − 19.

Al-Zghoul MB, Ismail ZB, Dalab AE, Al-Ramadan A, Althnaian TA, Al-Ramadan SY, Ali AM, Albokhadaim IF, Al Busadah KA, Eljarah A, Jawasreh KI, Hannon KM, 2015. Hsp90, Hsp60 and HSF-1 genes expression in muscle, heart and brain of thermally manipulated broiler chicken. *Res. Vet. Sci.*, 99: 105 − 111.

Arya R, Mallik M, Lakhotia SC, 2007. Heat shock genes − integrating cell survival and death. *J. Biosci.*, 32(3): 595 − 610.

Brocchier L, Karlin S, 2000. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci.*, 9(3): 476 − 486.

Colinet H, Lee SF, Hoffmann A, 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.*, 277(1): 174 − 185.

Damos P, Savopoulou-Soultani M, 2012. Temperature-driven models for

insect development and vital thermal requirements. *Psyche*, 2012: 1 - 13.

Feder ME, Hofmann GE, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 243 - 282.

Fenton WA, Kashi Y, Furtak K, Norwich AL, 1994. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, 371(6498): 614 - 619.

Ferro DN, Logan JA, Voss RH, Elkinton JS, 1985. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) temperature-dependent growth and feeding rates. *Environ. Entomol.*, 14(3): 343 - 348.

Gilles B, Warren C, 1996. Cold tolerance in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Can. Entomol.*, 128(6): 1087 - 1099.

Hartl FU, Hayer-Hartl M, 2009. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16(6): 574 - 581.

Hong B, Cheng DF, Tu EX, Guo WC, Chen L, Zhang YH, 2009. The relationships between temperature and development of the Colorado potato beetle in Xinjiang. *Plant Prot.*, 35(6): 60 - 63. [洪波, 程登发, 吐尔逊, 郭文超, 陈林, 张云慧, 2009. 新疆地区马铃薯甲虫发育与温度关系的研究. 植物保护, 35(6): 60 - 63]

Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW, 2007. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23: 115 - 145.

Huang LH, Chen B, Kang L, 2007. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. *J. Insect Physiol.*, 53(12): 1199 - 1205.

Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Mol. Biol.*, 16(4): 491 - 500.

Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa*. *J. Insect Physiol.*, 55(3): 279 - 285.

Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada K, Otaka M, Ogura M, Suzuki A, Hamada F, 2002. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *Eur. J. Biochem.*, 269(23): 5931 - 5938.

Jiang J, Li XR, Zhang YH, Guo WC, Cheng DF, Guo QY, 2013. cDNA cloning of heat shock protein 90 (Ld-hsp90) in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its expression under temperature stress. *Acta Phytophy. Sin.*, 40(5): 399 - 406. [蒋健, 李祥瑞, 张云慧, 郭文超, 程登发, 郭青云, 2013. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld-hsp*90 的克隆及温度胁迫下的表达. 植物保护学报, 40(5): 399 - 406]

Jiang XY, Guan XT, Yao LL, Zhang H, Jin X, Han Y, 2016. Effects of single and joint subacute exposure of copper and cadmium on heat shock proteins in common carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Trace Elem. Res.*, 169(2): 374 - 381.

Kaitazov A, 1964. Bioecological studies on the Colorado potato in Bulgaria. *Rast Vud. Nauki*, 1(2): 123 - 132.

Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU, 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, 82(8): 323 - 355.

Li C, Peng H, Cheng DF, Guo WC, Liu H, Zhang YH, Sun JR, 2014. Diffusion of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, adults in field. *Acta Ecol. Sin.*, 34(2): 359 - 366. [李超, 彭赫, 程登发, 郭文超, 刘怀, 张云慧, 孙京瑞, 2014. 马铃薯甲虫成虫田间扩散规律. 生态学报, 34(2): 359 - 366]

Li Y, Malkaram SA, Zhou J, Zempleni J, 2014. Lysine biotinylation and methionine oxidation in the heat shock protein HSP60 synergize in the elimination of reactive oxygen species in human cell cultures. *J. Nutr. Biochem.*, 25(4): 475 - 482.

Logan PA, Casagrande RA, Faubert HH, 1985. Temperature-dependent development and feeding of immature Colorado potato beetle. *Environ. Entomol.*, 14: 275 - 283.

Lu MX, Li HB, Zheng YT, Shi L, Du YZ, 2016. Identification, genomic organization and expression profiles of four heat shock protein genes in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *J. Therm. Biol.*, 57: 110 - 118.

Lü ZC, Wan FH, 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *J. Exp. Biol.*, 214(5): 764 - 769.

Lü ZC, Wang YM, Zhu SG, Yu H, Guo JY, Wan FH, 2014. Trade-offs between survival, longevity, and reproduction, and variation of survival tolerance in Mediterranean *Bemisia tabaci* after temperature stress. *J. Insect. Sci.*, 14: 124.

Lyytinen A, Mappes J, Lindström L, 2012. Variation in Hsp70 levels after cold shock: signs of evolutionary responses to thermal selection among *Leptinotarsa decemlineata* populations. *PLoS ONE*, 7(2): e31446.

Minder IF, Chesnek SI, 1970. The dependence of cold resistance in the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) on the time of the onset of diapause. *Zool. Zhurnal*, 49(6): 855 - 861.

Seveso D, Montano S, Strona G, Orlandi I, Galli P, Vai M, 2013. Exploring the effect of salinity changes on the levels of Hsp60 in the tropical coral *Seriatopora caliendrum*. *Mar. Environ. Res.*, 90(3): 96 - 103.

Seveso D, Montano S, Strona G, Orlandi I, Galli P, Vai M, 2014. The susceptibility of corals tothermal stress by analyzing Hsp60 expression. *Mar. Environ. Res.*, 99(4): 69 - 75.

Singh MP, Reddy MM, Mathur N, Saxena DK, Chowdhuri DK, 2009. Induction of hsp70, hsp60, hsp83 and hsp26 and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: role of ROS generation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 235((2): 226 - 243.

Smith HA, Burns AR, Shearer TL, Snell TW, 2012. Three heat shock proteins are essential for rotifer thermotolerance. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 413: 1 - 6.

Sørensen JG, Kristensen TN, Kristensen KV, Loeschcke V, 2007. Sex specific effects of heat induced hormesis in Hsf-deficient *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.*, 42(12): 1123 - 1129.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and

ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6 (11): 1025 – 1037.

Stratman KN, Overholt WA, Cuda JP, Mukherjee A, Diaz R, Netherland MD, Wilson PC, 2014. Temperature-dependent development, cold tolerance, and potential distribution of *Cricotopus lebetis* (Diptera: Chironomidae), a tip miner of *Hydrilla verticillata* (Hydrocharitaceae). *J. Insect Sci.*, 14(153): 1 – 8.

Tang YC, Chang HC, Roeben A, Wischnewski D, Wischnewski N, Kerner MJ, Hartl FU, Hayer-Hartl M, 2006. Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein. *Cell*, 125(5): 903 – 914.

Tilavov T, 1969. Changes in resistance to high temperature during the post-embryonal development of the Colorado potato beetle. *Zool. Zhurnal*, 48 (12): 1811 – 1815.

Wang DQ, Lu LZ, Tian Y, Li JJ, Shen JD, Tao ZG, Li GQ, Xu NY, 2012. Molecular cloning, characterization and expression patterns of heat shock protein 60 (HSP60) in the laying duck (*Anas platyrhynchos*). *Can. J. Anim. Sci.*, 92(4): 425 – 432.

Wang HH, Reitz SR, Wang LH, Wang SY, Li X, Lei ZR, 2014. The mRNA expression profiles of five heat shock protein genes from *Frankliniella occidentalis* at different stages and their responses to temperatures and insecticides. *J. Integr. Agr.*, 13 (10): 2196 – 2210.

Wang J, Wang DY, Hou H, 2008. Occurrence and control of Colorado potato beetle in Xinjiang. *J. Xinjiang Agric. Sci. Technol.*, (3): 60. [王俊, 王登元, 侯洪, 2008. 新疆马铃薯甲虫的发生与防治现状. 新疆农业科技, (3): 60]

Wong CS, Mak CH, Ko RC, 2004. Cloning and characterization of the mitochondrial heat-shock protein 60 gene of *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.*, 93(6): 461 – 467.

Xu XY, Shen YB, Fu JJ, Liu F, Guo SZ, Yang XM, Li JL, 2011. Molecular cloning, characterization and expression patterns of HSP60 in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.*, 31(6): 864 – 870.

Yocum GD, 2001. Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. *J. Insect Physiol.*, 47(10): 1139 – 1145.

Zhang GH, Li YY, Zhang KJ, Wang JJ, Liu YQ, Liu H, 2016. Effects of heat stress on copulation, fecundity and longevity of newly-emerged adults of the predatory mite, *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae). *Syst. Appl. Acarol.*, 21(3): 295 – 306.

Zhang YH, Zhang Z, He J, Tuerxun, Cheng DF, 2012. Cold hardiness of natural populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Plant Prot.*, 38(5): 64 – 67. [张云慧, 张智, 何江, 吐尔逊, 程登发, 2012. 马铃薯甲虫自然种群抗寒能力测定. 植物保护, 38(5): 64 – 67]

Zhang Z, Li C, Cheng DF, Zhang YH, Sun JR, Wei Z, 2010. Preliminary study of lethal effect of high temperature on the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. In: 2010 Public Plant Protection and Green Control. 2010 Academic Annual Conference of China Society of Plant Protection, Hebi, Henan. 838. [张智, 李超, 程登发, 张云慧, 孙京瑞, 魏政, 2010. 高温对马铃薯甲虫致死作用的初步研究. 见: 2010 公共植保与绿色防控. 中国植物保护学会 2010 年学术年会, 河南鹤壁. 838]

Zhao XM, Qin HL, 2016. Situation of monitoring and control for Colorado potato beetles and its countermeasures in Heilongjiang. *Plant Quarantine*, 30(1): 82 – 84. [赵星民, 秦海玲, 2016. 黑龙江省马铃薯甲虫监测防控形势及对策. 植物检疫, 30(1): 82 – 84]

Zhou ZX, Luo JC, Lü HP, Guo WC, 2010. Influence of temperature on development and reproduction of experimental populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(8): 926 – 931. [周昭旭, 罗进仓, 吕和平, 郭文超, 2010. 温度对马铃薯甲虫生长发育的影响. 昆虫学报, 53(8): 926 – 931]

Zhu YH, Lu XX, Wu D, Cai S, Li S, Teng XH, 2013. The effect of manganese-induced cytotoxicity on mRNA expressions of HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 and HSP90 in chicken spleen lymphocytes *in vitro*. *Biol. Trace Elem. Res.*, 156(1): 144 – 152.

(责任编辑: 马丽萍)